

## 一个枯草杆菌启动子( $P_{28-1}$ )对链霉菌分化的影响

谭华荣 徐冲\*\* 田宇清 徐健勇

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

Chater K F

(英国药翰英纳斯研究所 诺里季)

**摘 要** 亚克隆 1.1 kb 的枯草杆菌启动子  $P_{28-1}$  到 pUC19 上,再亚克隆到以儿茶酚加氧酶为报告基因的链霉菌启动子探测质粒 pIJ4083 上,构建的重组质粒命名为 pIJ4498。用 pIJ4498 转化天蓝色链霉菌 J1501 的原生质体,得到了相对于灰色野生型的白色转化子,而用载体 pIJ4083 转化 J1501 后得到的转化子是正常的深灰色菌落。经限制性内切酶验证了重组质粒的结构,测定了质粒的稳定性。当 pIJ4498 转化天蓝色链霉菌的 *whiG* 突变株(C71)后,未观察到任何表型的变化。通过超声波破碎细胞得到的 J1501/pIJ4498 菌体的蛋白提取液,可使无色的儿茶酚氧化成黄色的 2-羟粘糠酸半醛(HMS)。而对照株 J1501/pIJ4083 及 C71/pIJ4498 菌株的蛋白提取液不能使儿茶酚氧化成黄色的 HMS 产物。结果表明枯草杆菌的启动子  $P_{28-1}$  被天蓝色链霉菌 J1501 的  $\sigma^{whiG}$  RNA 聚合酶所识别,在启动儿茶酚加氧酶报告基因表达的同时,影响了天蓝色链霉菌 J1501 分化中的孢子形成。

**关键词** 链霉菌分化,孢子形成,  $\sigma^{whiG}$ ,  $P_{28-1}$

目前已知的数千种天然抗生素中,约 70% 由链霉菌产生<sup>[1]</sup>,而抗生素的合成通常又与链霉菌的形态分化有关<sup>[2]</sup>,并受到分化调节的影响。因此,对链霉菌分化调控的研究不但有重要的理论意义,也有潜在的应用前景。天蓝色链霉菌中与分化有关的几个白基因(*whi*)已被克隆和 DNA 顺序分析<sup>[3-5]</sup>,其中白基因 G(*whiG*)是孢子形成早期的一个关键基因<sup>[4]</sup>。*whiG* 突变株由于 *whiG* 被阻断,气生菌丝长而直,不能螺旋形成孢子而导致菌落呈现白色表型<sup>[3]</sup>。以前的研究结果表明,*whiG* 编码的产物是一个  $\sigma$  因子,称之为  $\sigma^{whiG}$ <sup>[6]</sup>。天蓝色链霉菌的  $\sigma^{whiG}$  与枯草杆菌的  $\sigma^D$ ( $\sigma^{28}$ )非常类似,同时发现依赖于  $\sigma^{whiG}$  的链霉菌的两个启动子  $P_{TH4}$  和  $P_{TH270}$  与依赖于  $\sigma^D$  的枯草杆菌的启动子  $P_{28-1}$  在 -35 区和 -10 区的同源性较高<sup>[7]</sup>。而当  $P_{TH4}$  和  $P_{TH270}$  两个启动子引入到链霉菌的高拷贝启动子探测质粒 pIJ4083,然后转化天蓝色链霉菌 J1501 后,使儿茶酚加氧酶报告基因得到表达的同时,限制了 J1501 孢子的形成,使其出现相对于灰色野生型的白色表型。在此基础上,我们推测如果把高拷贝的枯草杆菌的启动子  $P_{28-1}$  引入到链霉菌中,是否能在使儿茶酚加氧酶报告基因表达的同时,也能影响链霉菌分化中孢子的形成,本文报道了这一研究结果。

• 国家自然科学基金和中国科学院“八五”重点基金资助项目。

\*\* 现通讯地址:中国科学技术大学生物系(合肥 230026)。

本文于 1993 年 7 月 5 日收到。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*E. coli*)JM109 和质粒 pUC19 为本研究组收藏。天蓝色链霉菌 J1501 (*Streptomyces coelicolor* J1501) (*hisA1*, *uraA1*, *strA1*, *SCP1*<sup>-</sup>, *SCP2*<sup>-</sup>, *pgl*<sup>-</sup>), 天蓝色链霉菌 A3(2) *whiG* 阻断突变株 C71 (*whiG71*) 和质粒 pMG102 均由 Chater 教授提供。质粒 pIJ4083 (带有无启动子的儿茶酚加氧酶报告基因 *xyIE*) 由 Bibb 博士赠送。

### 1.2 培养基

大肠杆菌用 LB 培养基, 按照文献[8]方法配制。天蓝色链霉菌液体生长培养基 (YEME), 原生质体再生培养基 (R2YE) 及基本培养基 (MM) 均按文献[9]配制。

### 1.3 抗生素

羧苄青霉素 (Cb, Carbenicillin) 贮存液浓度为 50mg/ml, 使用浓度为 50  $\mu$ g/ml。硫链丝菌素 (Thio) 贮存液浓度为 100mg/ml, 在 R2YE 培养基中使用浓度为 50 $\mu$ g/ml, 在 MM 中为 7 $\mu$ g/ml, 上述抗生素贮存液均放 -20℃ 冰箱保存。

### 1.4 酶和试剂

所用限制性内切酶 EcoRI, Hind III 及 PstI 均为华美生物工程公司产品。T4 DNA 连接酶为 Boehringer 公司产品。儿茶酚为 Chater 教授提供。

### 1.5 质粒 DNA 的提取、纯化及 DNA 片段的回收

按文献[9,10]方法进行。

### 1.6 大肠杆菌感受态细胞的制备及转化

按文献[8,11]进行。

### 1.7 链霉菌原生质体制备、再生及转化

基本上按文献[9,10]方法进行。

### 1.8 酶法测定

儿茶酚加氧酶定性测试可在比色板上进行。培养收集的链霉菌菌丝体或孢子经超声波破碎, 离心等可获得粗酶提取液。直接把此提取液与 0.5mol/L 的儿茶酚溶液适当混合, 约 15 分钟后可观察到黄色产物。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒的构建

将质粒 pMG102 用 PstI-EcoRI 双酶切, 用软琼脂法回收 1.1kb 的含有 P<sub>28-1</sub> 启动子片段。同时, 用 PstI 和 EcoRI 双酶切质粒载体 pUC19, 将 P<sub>28-1</sub> 和 pUC19 用 T4 DNA 连接酶连接, 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 利用 Cb 和 X-Gal/IPTG 筛选得到了 Cb<sup>R</sup> 的白色转化菌株。经质粒提取和酶切验证, 构建的重组质粒是正确的, 此重组质粒命名为 pXJ101 (图 1 和图 2)。质粒 pXJ101 的构建改造了 P<sub>28-1</sub> 的两端的酶切位点, 使 P<sub>28-1</sub> 适合于进一步在链霉菌质粒 pIJ4083 上的亚克隆。用 Hind III 和 EcoRI 双酶切 pXJ101, 用 DEAE 滤纸法回收 P<sub>28-1</sub> 片段。在 T4 DNA 连接酶的作用下, 把 P<sub>28-1</sub> 启动子片段与 Hind III 和 EcoRI 酶切

后的 pIJ4083 进行连接,构建成重组质粒 pIJ4498(图 1)。

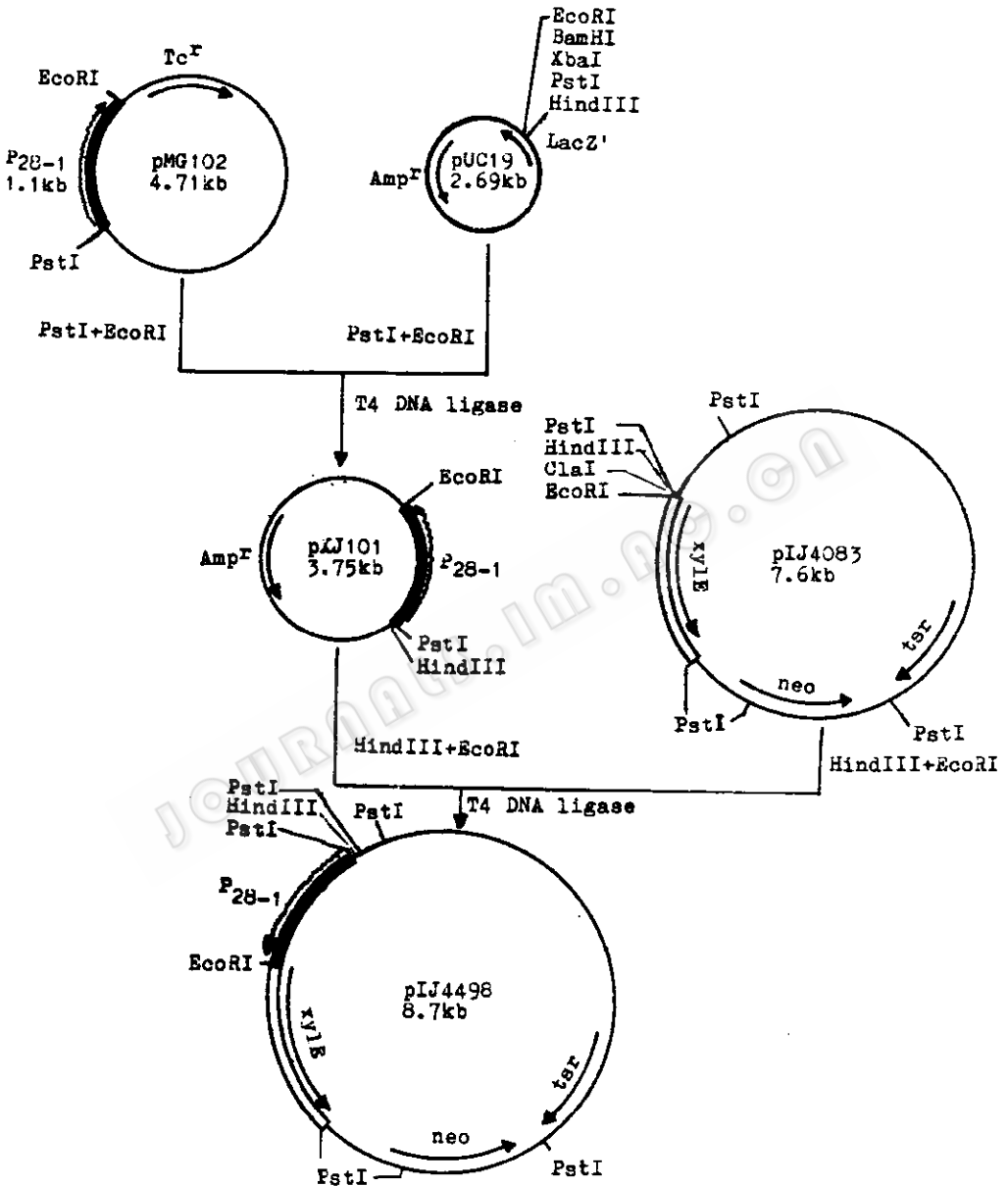


图 1 质粒 pIJ4498 的构建  
Fig. 1 The construction of pIJ4498

## 2.2 重组质粒的链霉菌原生质体转化及酶切分析

天蓝色链霉菌 J1501 的菌丝体经溶菌酶(2mg/ml)30℃处理 120 分钟后,相差显微镜

检查,菌丝体基本上都形成原生质体。用 pIJ4498 转化 J1501 的原生质体,涂布 R2YE 再生培养基,约培养 16 小时后加入 Thio(50 $\mu$ g/ml),继续培养四天后筛选到 Thio<sup>R</sup> 的转化菌株。经液体菌丝体培养,提取到了重组质粒 pIJ4498。经 Hind III 和 EcoRI 酶切 pIJ4498,得到了两个大小不同的 DNA 片段,在 EcoRI 酶切的 SPP1 标准分子量对照下,小片段是 1.1kb 的 P<sub>28-1</sub>,而大片段与 pIJ4083 Hind III-EcoRI 酶切的片段大小相同是 7.6kb 的载体 pIJ4083(图 2)。结果表明构建的重组质粒 pIJ4498 的结构是正确的。

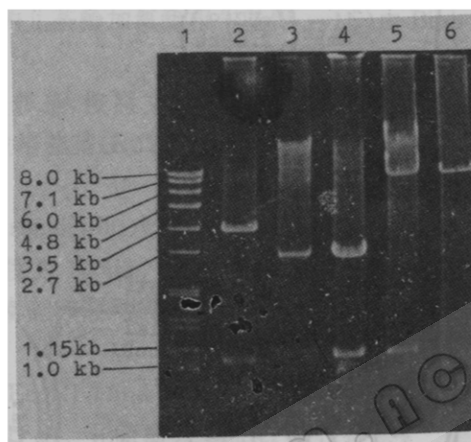


图 2 重组质粒酶切的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmids digested with restriction enzymes

- |                             |                             |
|-----------------------------|-----------------------------|
| 1. <i>sppl</i> + EcoRI;     | 2. pMG102 + PstI-EcoRI;     |
| 3. pUC19 + PstI-EcoRI;      | 4. pXJ101 + HindIII-EcoRI;  |
| 5. pIJ4498 + HindIII-EcoRI; | 6. pIJ4083 + HindIII-EcoRI. |

### 2.3 儿茶酚加氧酶报告基因的表达

定性试验结果表明,从 J1501/pIJ4498 的 60 小时和 72 小时培养的菌体,提取的粗酶提取液可使无色的儿茶酚氧化成黄色的 2-羟粘糠酸半醛(HMS)(图版 1-A,B),而对照株 J1501/pIJ4083 的粗酶提取液则不能使儿茶酚氧化成黄色的 HMS 产物(图版 1-C)。而且 C71/pIJ4498 的粗酶提取液也不能使无色的儿茶酚氧化成黄色的 HMS 产物。这表明,枯草杆菌的启动子 P<sub>28-1</sub> 在天蓝色链霉菌 J1501 中启动了儿茶酚加氧酶报告基因,表达产生了有活性的儿茶酚 2,3-双加氧酶,由于 J1501 含有的质粒 pIJ4083 不具有启动子,故儿茶酚加氧酶报告基因不能表达。而 C71/pIJ4498 的粗酶提取液不具有儿茶酚加氧酶活性,是由于 *whiG* 的基因产物是一个  $\sigma$  因子。而 C71 的 *whiG* 基因被阻断,不能合成  $\sigma^{\text{whiG}}$  RNA 聚合酶去特异性地识别 P<sub>28-1</sub>,因此 P<sub>28-1</sub> 不具有启动子功能。

### 2.4 P<sub>28-1</sub> 对 J1501 孢子形成的影响

用 pIJ4498 转化 J1501 后,在含有 Thio(5 $\mu$ g/ml)的 MM 上,培养 4—5 天后,观察到 J1501/pIJ4498 的孢子形成受到限制,其白色的气生菌丝不能形成成熟的灰色孢子或孢子量极少,导致菌落呈现白色的表型(图版 1-D),而对照株 J1501/pIJ4083 仍可形成丰富的孢子,菌落呈现灰色(图版 D)。由此推测,高拷贝的 pIJ4498 上的 P<sub>28-1</sub> 竞争性地与  $\sigma^{\text{whiG}}$

RNA 聚合酶结合,使 J1501 细胞中的  $\sigma^{whiG}$  的量大大降低,影响了  $\sigma^{whiG}$  与天然靶基因启动子的结合,从而使 J1501 分化中的孢子形成受到限制,导致 J1501/pIJ4498 出现与 *whiG* 突变株 C71 相似的白色表型。从而说明了  $P_{28-1}$  对  $\sigma^{whiG}$  有一定的依赖关系。

### 3 讨论

从 J1501/pIJ4498 的不同培养时间(36,48,60,72,84 及 96 小时)所提取的蛋白提取液,取一定量稀释至 3ml,加入 50 $\mu$ l 0.2mol/L 儿茶酚溶液,10 分钟后,在 LKB 分光光度计  $\lambda=375\text{nm}$  处测定 OD 值。结果表明从 72 小时培养的菌体得到的蛋白提取液 OD 值最高,酶活力也最高。此培养时间也是菌体生长最佳时期。推测此时 J1501/pIJ4498 的细胞内合成的  $\sigma^{whiG}$  量较高,使高拷贝的启动子  $P_{28-1}$  的活性功能更强,从而使儿茶酚加氧酶报告基因得到高表达。

在以链霉菌的质粒 pIJ4083 上的儿茶酚加氧酶报告基因检测启动子的活性强度时,一般是在含有 Thio(5 $\mu$ g/ml)的 MM 平皿上进行<sup>[7,12]</sup>。我们进行了 J1501/pIJ4498 的不同时间的平皿培养(72,96 和 120 小时),然后在平皿上喷布无色底物儿茶酚,但都未观察到具有黄色产物的菌落。根据我们的实验结果推测枯草杆菌的启动子  $P_{28-1}$  不是很强的启动了儿茶酚加氧酶报告基因的表达,而且大部分表达的产物是在胞内,只有少部分在胞外,因此,在平皿上难以检测到。

我们的研究结果证实了枯草杆菌的启动子  $P_{28-1}$  确实可依赖于  $\sigma^{whiG}$ ,并且影响了链霉菌的孢子的形成,这为进一步进行 *whiG* 高表达及  $\sigma^{whiG}$  功能的研究提供了一定的检测方法,同时对研究原核生物分化发育过程中基因表达调控的相互关系具有重要意义。

### 参 考 文 献

- [1] Berdy J. *Process Biochemistry*, 1980, Oct/Nov, 28-35.
- [2] 谭华荣. 微生物学通报, 1993, 20(6): 348-354.
- [3] Mendez C, Chater K F. *J. Bacteriol*, 1987, 163: 5715-5720.
- [4] Chater K F, Bruton C J, Plaskitt K A *et al.* *Cell*, 1989, 59: 133-143.
- [5] Davis N F, Chater K F. *Mol Microbiol*, 1990, 4: 1679-1691.
- [6] Chater K F, Bruton C J, Davis N F *et al.* Gene expression during sporulation in *S. coelicolor* A3(2). In: Baumberg *et al.* ed. *Genetics and Product formation in Streptomyces*. New York: Plenum Press, 1991. 3-9.
- [7] Tan H, Chater K F. *J Bacteriol*, 1993, 175(4): 933-940.
- [8] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- [9] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F *et al.* *Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual*. John Innes Foundation, Norwich, England, 1985.
- [10] Tan H. Ph. D. thesis, University of East Anglia Norwich, England, 1991.
- [11] 谭华荣, 何松, 庄增辉, 等. 遗传学报, 1990, 17(5): 390-397.
- [12] Clayton T M, Bibb M J. *Nucl Acids Res*, 1989, 18: 1077.

# THE EFFECT OF A PROMOTER $P_{28-1}$ OF *BACILLUS SUBTILIS* ON *STREPTOMYCES* DIFFERENTIATION

Tan Huarong Xu Chong Tian Yuqing Xu Jianyong

(Institute of microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Chater K F

(John Innes Institute, Norwich, England)

**Abstract** A 1.1kb promoter  $P_{28-1}$  was inserted into pUC19. After then, the  $P_{28-1}$  was subcloned into the HindIII-EcoRI sites of the high copy number *Streptomyces* promoter probe plasmid pIJ4083 containing *xylE* reporter gene. This recombinant plasmid was designated as pIJ4498. When pIJ4498 was introduced into *Streptomyces coelicolor* J1501 protoplasts, transformants conferred a white phenotype, whereas the vector pIJ4083 gave rise to colonies of normal, dark grey appearance which is the same as that of J1501 itself. After confirming pIJ4498 structure with some restriction enzymes, it was also introduced into *whiG* mutant (C71). Crude enzyme extracts were isolated from J1501/pIJ4498, J1501/pIJ4083 and C71/pIJ4498 respectively, the crude enzyme extract from J1501/pIJ4498 could oxidize catechol (colourless) to 2-hydroxy muconic semialdehyde (yellow colour), but crude enzyme extracts from J1501/pIJ4083 and C71/pIJ4498 could not oxidize catechol to 2-hydroxymuconic semialdehyde. The results indicated that  $P_{28-1}$  might be recognised by  $\sigma^{whiG}$  RNA polymerase, and activated the *xylE* reporter gene expression and reduced J1501 sporulation.

**Key words** *Streptomyces* differentiation, Sporulation, *whiG*,  $P_{28-1}$

## 图版说明

### Explanation of plate

A 和 B. 从 J1501/pIJ4498 的 60 小时和 72 小时培养提取的粗酶提取液, 能使无色的底物儿茶酚氧化成 2-羟粘糖酸半醛的黄色产物。

C. 从 J1501/pIJ4083 的 72 小时培养提取的粗酶提取液, 不能使儿茶酚氧化成 2-羟粘糖酸半醛。

D. 枯草杆菌启动子  $P_{28-1}$  对链霉菌分化的影响。

J1501/pIJ4083 呈灰色形型, 而 J1501/pIJ4498 呈白色表型。

A and B. Crude enzyme extract was isolated from J1501/pIJ4498 with cultures of age 60 and 72h respectively, and the extract could oxidize catechol (colourless) to 2-hydroxy muconic semialdehyde (yellow colour).

C. Crude enzyme extract was isolated from J1501/pIJ4083 with culture of age 72h, and the extract could not oxidize catechol to 2-hydroxy muconic semialdehyde.

D. The effect of a promoter  $P_{28-1}$  of *B. subtilis* on *Streptomyces* differentiation.

J1501/pIJ4083 conferred a grey phenotype, but J1501/pIJ4498 conferred a white phenotype.